

돼지에서 Open Pulled Straw(OPS) 방법에 의해 동결-융해한 수정란의 생존능력

이상영[†] · 유재숙 · 사수진¹ · 박춘근¹
경상남도침단양돈연구소 생명공학과

Survival and Development of Porcine Embryos Produced *in vitro* Using Open Pulled Straw Methods

S. Y. Lee[†], J. S. Yu, S. J. Sa¹ and C. K. Park¹

Biotechnology Division, Gyeongsangnam Province Advanced Swine Research Institute,
Sanchung, 666-962, Korea

SUMMARY

The purpose of this study is to investigate the effects of vitrification in open pulled straws (OPS) methods on *in vitro* survival ability of porcine embryos. For *in vitro* maturation of immature oocytes, the porcine ovaries were collected from local slaughter-house. The cumulus-oocytes complexes were aspirated from 2 to 6 mm follicles. The collected oocytes were cultured for *in vitro* maturation in NCSU-23 medium with 5 mM hypotaurine, 0.57 mM cysteine, 10% porcine follicle fluid, 10 IU/ml PMSG and 10 IU/ml hCG for 21~22 hrs. Then, the oocytes were more cultured 21~22 hrs *in vitro* maturation in medium removed hormones. The frozen-thawed spermatozoa were washed by centrifugation 2 times for 10 min at 1,500 rpm in D-PBS with 5.56 mM glucose, 0.33 mM Na-pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 4 mg/ml BSA. The fertilization medium used mTBM with 2 mM caffeine and 2 mg/ml BSA and adjusted to a pH of 7.2 to 7.4. The final concentration of spermatozoa was adjusted to 2.5×10^6 cells/ml motile sperm during fertilization *in vitro*. At 8 hrs after insemination, the oocytes were transferred into NCSU-23 medium with 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA and 10 ng/ml EGF and cultured for 7 days. When the blastocysts of different stages were frozen-thawed by OPS methods, the proportions of embryos with normal morphology were significantly ($p < 0.05$) higher in embryos frozen-thawed at expanded blastocyst stage (38.9%) than in early blastocyst stage (28.3%). On the other hand, the proportions of embryos damaged after frozen-thawing were significantly ($p < 0.05$) higher in embryos frozen at early blastocyst stages than in expanded blastocyst stage. In another experiment, the normal embryos morphology after frozen-thawing were further cultured for 48 hrs. After culture, the proportions of embryos hatched were 6.7, 20.0 and 33.3% for embryos frozen-thawed at early blastocyst, mid-blastocyst and expanded blastocyst stages. These finding indicate the possible broader application for OPS methods, as

¹ 강원대학교 동물생명과학대학(College of Animal Life Sciences, Kangwon National University)

[†] Correspondence : E-mail : sylee@gsnd.net

frozen-thawed embryos may be accompanied by developmental stages according to requirements of the survival ability after freezing of blastocyst stage in the pig.

(Key words : frozen-thawed embryos, *in vitro* development, OPS methods, pig, survival ability)

서 론

생명 공학 기술의 발전으로 포유 동물의 난자 및 수정란의 수요가 급증되고 있어, 세대 간격이 짧고 산자수가 많아 생산성이 높은 동물인 돼지가 생명 공학 연구 실험 동물로 타포유 동물에 비하여 경제적이고 효과적인 실험 동물로 평가 받으면서 돼지의 수정란 생산 이용에 관한 연구도 가속화되고 있다. 그러나 복제 동물 및 형질 전환 동물 생산 등의 생명 공학 연구가 활발하게 진행되기 위해서는 난자 및 수정란의 대량 생산, 보존 및 공급 체계에 대한 확립이 요구되고 있는 실정이다.

발생 공학과 관련된 연구의 기본 재료가 되는 난자 및 수정란의 대량 확보 및 공급 수단으로 여러 동물종에서 관심이 높아지고 있고(Kim 등, 2001), 돼지 수정란의 대량 확보 및 공급을 위한 동결 보존 분야에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 타 동물의 경우엔 생식세포인 정자 및 난자의 동결 보존에 대한 연구가 상당히 진전된 것과는 달리 상대적으로 돼지의 경우 정자뿐 아니라 난자의 동결 보존에 관한 연구는 아직도 해결해야 될 많은 과제를 안고 있는 실정이다(이 등, 2006). 이와 같은 원인은 돼지 난자의 동결시 세포내의 지방구 방출에 따른 세포 상해와 동결 보호제의 삼투에 의한 세포질의 응축, 낮은 온도에서 세포질 내 미세소관들이 민감하게 반응하기 때문에 동결 보존하는데 어려움을 겪고 있는데(Kaidi 등, 2000; Park과 Ruffing, 1992), 이러한 원인은 돼지 난자의 세포질 내에는 지방구가 다량 함유되어 있어 동결 보존시 상해가 다른 동물 종에 비하여 매우 심한 것으로 알려져 있으며(Dobrinisky, 2001), 미성숙 난자의 경우 성숙 난자보다 낮은 온도에 더 민감하여 세포 상해를 입어 동결 보존의 기술적인 문제에 많은 어려움을 겪고 있다(Kim 등 2001). 그런데 지금까지 이용되어온 slow-rate freezing에 의한 돼지 수정란의 동결 보존은 많은 양의 지방구가 세포내에서 방출되는 현상을 보임과 동시에 동결

전후의 위험 온도를 극복하지 못하여 생존성에 커다란 결정적인 요인이 되어(김 등, 2001), 이를 극복하기 위하여 Centrifugation과 Micromanipulation을 이용한 세포질 내 지방구 제거 후 동결 방법(Ushijama 등, 1996)과 초급속 동결 방법인 Open pulled straw(OPS) 기법(Vajta 등, 1997a)이 개발되었고, 그 후 수정란을 동결-융해하여 효과적인 결과를 얻은 OPS 동결 융해한 후 이식하여 돼지 산자의 출산에 성공하였다(Berthelot 등 2000). 그러나 국내에서는 돼지 수정란의 동결 보존 연구가 지속적으로 수행되어 왔으나 동결 수정란 이식에 의한 돼지 산자의 출생이 이루어지지 않았을 뿐 아니라(최 등, 2006; 안 등, 2004; 김 등, 2002; 김 등, 1998; 이 등, 1997; 정 등, 1990), OPS법에 의한 돼지 수정란의 동결-융해와 이식에 관한 연구도 다수 이루어졌으나 아직도 불충분한 실정이다(이 등, 2006; 이 등, 2004; 김인덕 등, 2004ab; Kim 등, 2001). 따라서 본 연구에서는 난자의 동결 시 동해를 최소화시키는 방법으로 알려진 OPS법에 의해 돼지 배반포기 수정란을 발육 단계별로 구분하여 동결-융해 후 생존성을 검토하여 돼지 수정란의 동결 보존 체계를 확립하여 생명 공학 연구에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 기본 배양액

난자의 체외 성숙 및 체외 배양을 위해 기본 배양액으로는 10.873 mM NaCl, 0.478 mM KCl, 0.17 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.119 mM KH₂PO₄, 0.119 mM MgSO₄ · 7H₂O, 25.0 mM NaHCO₃, 1.00 mM glutamine, 7.00 mM taurine, 5.55 mM glucose, 50 μg/ml gentamycin이 첨가된 NCSU-23(North Carolina State University-23)을 사용하였다.

2. 미성숙 난포난자의 회수

난소는 도살 직후 돼지에서 회수하여 35~37℃

의 생리식염수에 침적하여 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포액은 10 ml 주사기에 18-gauge 주사침을 장착하여 직경 2~6 mm의 포상난포로부터 흡입·회수한 후 실험현미경하에서 형태학적으로 세포질과 난구세포가 균일한 난포란을 선택하여 TL-Hepes(114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaHPO₄ · H₂O, 10.0 mM Na lactate, 2.0 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.5 mM MgCl₂ · 6H₂O, 10.0 mM Hepes, 100 IU penicillin, pH 7.4, 280 Osm로 적정)로 3회 세척한 후 체외 성숙배양에 이용하였다.

3. 난자의 체외 성숙

채란된 난자는 형태적으로 정상적이며 난구세포의 균일성과 세포질이 정상인 것만을 선택하여 체외 성숙에 사용하였다. 체외 성숙용 배양액은 5.0 mM hypotaurin, 0.57 mM cysteine, 10% pFF, 10 IU/ml PMSG 및 10 IU/ml hCG가 함유된 NCSU-23(Wang 등, 1997) 배양액에서 체외 성숙 초기 21~22시간 배양하고, 체외 성숙 후기에는 호르몬의 영향을 받지 않으므로 호르몬 물질을 제거한 성숙 배양액 내에서 21~22 시간 동안 추가 성숙배양을 실시하였다(Funahashi와 Day, 1993).

4. 체외 수정

체외 수정은 48 시간동안 체외 성숙시킨 난자를 0.1% hyaluronidase가 함유된 배양액내에서 난구세포를 제거하였다. 이후 난자는 수정용 배양액에서 3회 세척하여 45 μl 소적 내에 난자를 5 개씩 넣고 정자를 첨가할 때까지 39℃의 5% CO₂ 조건의 인큐베이터 내에 넣어두었다. 동결 정액 straw는 37℃에서 30초간 용해 후 5.56 mM glucose, 0.33 mM Na-pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 및 4 μg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액을 가지고 1,500 rpm에서 10분간 2회 원심분리를 실시하여 세척하였다. 체외 수정을 위한 배양액은 pH 7.2~7.4에서 2 mM caffeine과 2 mg/ml BSA가 첨가된 modified Tris Buffer Medium (mTBM) 배양액을 이용하였다. 체외 수정시 정자의 최종 농도는 2.5×10⁶ cells/ml로 조정하여 준비한 수정용 소적 내에 5 μl를 첨가하여 체외 수정

을 실시하였다.

5. 체외 배양

체의 수정 8시간 후, 체외 발육을 위하여 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액에 10 ng/ml epithelial growth factor(EGF)를 첨가하여 체외 배양액을 준비하였다. NCSU-23 배양액 45 μl 소적에 10개씩의 수정란을 넣어 39℃, 5% CO₂ 그리고 포화 습도가 유지되는 배양기내에서 7일간 배양하여 배반포로 발달한 수정란을 공시하였다.

6. OPS 동결-융해

OPS 동결은 Vajta 등(1997b)에 보고된 동결 과정을 변형하여 이용하였다. 동결을 위한 Holding Medium(HM)은 TCM-199(Gibco, Life Technologies INC., USA)에 2.5 mM Hepes, 20% FCS를 첨가하여 기본 배양액으로 하였으며, sucrose media는 TCM-199에 0.6 M sucrose, 20% FCS를 첨가하여 사용하였다. 동결에 사용되는 동결액 조성에서 vitrification solution(VS)1은 holding media에 10% ethylene glycol(EG), 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 사용하였고, VS2는 sucrose media에 20% EG, 20% DMSO를 첨가하여 사용하였다. 동결과정은 4 well dish에 HM, VS1을 첨가한 후 mineral oil로 피복하여 실험 시작 전 2~3시간 동안 preincubation을 실시하였다. 한편 난자는 HM에 옮겨가며 세척을 실시한 후 VS1에서 3분 동안 평형을 실시하여 VS2 100 μl 소적에 옮겨 다시 세척하였다. 세척 과정에서 30초간 동해 보호제에 노출 후 즉시 2 μl 소적에 5개의 난자를 넣어 모세관 작용에 의해 난자를 흡입한 후 바로 -196℃ LN₂내에 침적하여 동결을 실시하였다. 동결된 Straw는 LN₂ container에 옮겨 7일 이상 보관한 후 용해하여 실험에 이용하였다. 용해 media는 HM과 0.6 M sucrose 액을 2:1의 비율로 혼합하여 thawing medium(TM1)으로 사용하였으며, TM2는 HM과 0.6 M sucrose를 4:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. Straw는 LN₂ container내에서 꺼내는 즉시 TM1 media에 넣어 5분 동안 용해한 후 TM2에서 5분간 유지하다가 HM에서 5분 동안 용해하였다.

7. 수정란의 생존 능력 조사

융해 후 수정란의 생존 능력 조사는 형태적인 정상성 검사와, 형태적으로 정상인 배반포 수정란을 체외 배양하여 발달율을 조사하였다. 형태적인 정상성 검사는 배반포의 정상적 외형을 나타내고 있는 수정란(Intact)과 변형되거나 손상된 수정란(damaged)으로 구분하였으며, damaged 수정란은 투명대 또는 분할구가 정상을 나타내며 일부가 손상된 수정란(partial)과 투명대 또는 분할구가 심하게 깨어졌거나 탈수된 수정란(complete)으로 구분하였다. 그리고 체외 배양하여 발달율 조사는 형태적으로 정상인 수정란을 NCSU-23 배양액에 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA 및 10 ng/ml EGF를 첨가하여 48시간 배양하여 생존능력을 조사하였다.

8. 통계 분석

자료의 분석은 통계 분석 프로그램인 SAS를 이용한 GLM 분석을 하여 유의성 검정을 하였다.

결 과

Table 1에서 나타낸 바와 같이 돼지 배반포를 발육 단계별로 분류하여 OPS 방법으로 동결-융해 후 형태적인 정상 성을 검사한 결과는 초기 배반포와 배반포 및 후기 배반포가 각각 28.3, 34.5 및 38.9%의 성적을 보여 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 발육 단계가 높을수록 형태적으로 정상인 수정란이 많은 경향을 나타내었다. 또한 수정란의 동해는 초기 배반포와 배반포 및 후기 배반포에서 각각 71.7, 65.5와 61.1%를 나타내어 유의차는 인정되지 않았으나 발육 단계가 빠를수록 동해를 많이 받았다.

돼지 수정란을 OPS 기법으로 동결/융해 후 형태적으로 정상인 배반포를 48시간 배양한 후 생존율은 Table 2에 나타내었다. 배반포기 발육 단계별로 48시간 배양 후 발육이 진행된 수정란은 초기 배반포와 배반포 및 후기 배반포가 각각 20.0, 25.0 및 33.3%를 나타내었다. 48시간 배양 후 부화된 수정란은 후기 배반포 (33.3%)가 제일 높았고 배반포(20.0%)와 초기 배반포(6.7%) 순으로, 통계적 유의성은 인정되지 않았으나 발육 단계가 높은 배반포를 동결-융해하였을 때 생존율이 높은 경향을 보였다.

Table 1. Morphology of porcine embryos after frozen-thawing by OPS methods

Stage of blastocyst	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered after thawing	Morphology of embryos thawed (%)			
			Intact	Damaged		
				Partial	Complete	Total
Early Blastocyst	55	53	15 (28.3) ^b	21 (39.6) ^a	17 (32.1)	38 (71.7)
Mid-Blastocyst	62	58	20 (34.5) ^{ab}	17 (29.3) ^{ab}	21 (36.2)	38 (65.5)
Expanded Blastocyst	57	54	21 (38.9) ^a	13 (24.1) ^b	20 (37.0)	33 (61.1)

^{a,b} Different superscript letters in each column indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 2. Development after *in vitro* cultured for 48hrs in Frozen-thawed porcine embryos

Stage of embryos cultured	No. of embryos cultured	No. of developed to (%)		
		Total	Expended	Hatching
Early Blastocyst	15	3 (20.0)	2 (13.3)	1 (6.7)
Mid-Blastocyst	20	5 (25.0)	1 (5.0)	4 (20.0)
Expanded Blastocyst	21	7 (33.3)	-	7 (33.3)

고찰

본 연구는 돼지 미성숙 난자를 체외에서 성숙, 수정시킨 뒤, 체외 수정란의 배양시 성장 인자와 항산화제의 첨가하여 체외 배양된 blastocyst 단계의 수정란을 OPS Vitrification 방법으로 동결 용해 후 생존성을 검토하였다.

고능력 동물의 생산, 특정 유용 물질의 생산을 위한 Bioreactor의 생산 및 의학 분야에서 장기이식을 목적으로 한 장기 이식용 동물의 생산에 생식세포를 이용한 생명 공학 기술의 개발과 활용을 위하여 난자 및 수정란의 안정적인 공급이 필요하다. 안정적인 수정란의 공급의 일환으로 최근년에 들어서는 수정란의 동결 보존을 위한 여러 가지 새로운 방법들이 발표되었는데 그 가운데 초자화 동결법이 개발되면서 동결 보존이 보편화 되었고, 일반적으로 사용된 Slow-rates freezing 법에 대한 좋은 변화로 간주되고 있다. 현재 수정란의 경우, 동결과 용해 속도에 대한 연구에 관심이 집중되었는데, Electron microscopy grid(Park 등, 1999), Open pull straw법(Lewis 등, 1999; Vajta 등, 1997b)과 Nylon-loop(Lane과 Gardner, 2001)등이 개발되었다. Vajta 등(1998)은 OPS 방법이 동결과 용해율을 증가시켰으며, 동결 보호제를 낮은 농도로 사용함으로써 독성을 감소시키고 삼투압 손실을 줄이는 것으로 보고했다. OPS 방법이 쉽고 유용하게 사용될 수 있지만 LN₂내에 직접 넣어 straw가 떠다니므로 동결 속도의 감소에 의해 난자에 손상을 줄 가능성이 있지만 이들 기술적인 문제만 해결된다면 매우 효과적인 동결 법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다(Kim 등, 2001). 그러나 OPS 동결 보존은 생쥐, 소, 토끼 등에서 많은 성과와 체계가 확립된 반면 낮은 온도에 특히 민감한 돼지의 경우 그 연구 결과가 적으며 성과도 거의 없다. 동결 보존 후 난자의 생존율에 있어서 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결-용해 과정 중 사용되는 동해 방지제의 종류, 농도 및 처리 시간이다. 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동해 방지제로서 DMSO, Glycerol 그리고 1,2-PROH를 사용하고 있으며(김 등, 2002), 그러나 최근에는 Martino 등(1996)이 소 성숙 난자를 ethylene glycol을 사용

하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 ethylene glycol을 많은 연구자들이 사용하고 있다. 비침투성 동해 방지제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민 등이 있으나, 다른 동해 방지제의 불필요한 세포내 침투를 완화 시켜 세포 독성을 감소시키고 세포질 내 단백질의 농도를 증가시킴으로써 냉각 충격을 완화시키고 초자화를 돕는 것으로 보고되고 있는 glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kim 등, 1996; Rayos 등, 1994; Zhu 등, 1993). 본 연구는 OPS vitrification 방법에 의한 돼지 배반포기 수정란의 동결-용해 후 형태적인 정상성과 생존성을 검토하였다. 그 결과 동결-용해 후 수정란의 형태적으로 정상성에서는 초기 배반포(28.3%)에 비하여 배반포(34.5%)와 후기 배반포(38.9%)가 유의적으로 높은 성적을 나타내었다($p < 0.05$).

이러한 결과는 수정란의 발육 단계가 높을수록 발육의 지연 또는 정지되는 수정란보다는 정상적으로 발육이 진행된다는 것과 같은 결과이다. 그러나 형태적으로 정상성만으로는 생존성을 판정할 수 없어 동결-용해 후 48시간 배양 후의 생존성을 검토한 결과에서도 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 발육 단계가 높을수록 후기 배반포와 부화까지 발육율의 성적이 높게 나타났다. 이러한 결과는 Dobrinsky 등(2000)은 난자 동결시 세포 골격을 안정화 시키는데 기여하여 미세구조 파괴 방지에 유사 분열 억제제로 사용되는 Cytochalasin-b가 돼지 수정란의 vitrifications 동결에 미치는 영향의 실험에서는 발육 단계가 높을수록 생존율이 유의적으로 높다는 결과와 대체로 일치하였다($p < 0.05$). 한편 Vajta 등(1997b)이 다양한 발육 단계의 돼지 수정란을 OPS vitrification 방법으로 동결 용해 후 생존성 실험에서 상실배 이상 발육 단계의 수정란의 생존율(91%)과 부화율(67%)의 성적과는 차이를 보였으며, 상실배 이상 발육 단계의 수정란의 생존율과 부화율은 크게 다르지 않다는 결과와는 차이를 나타내었으나, 동일 실험에서 8~16세포기의 생존율과 부화율은 유의적으로 낮은 성적을 나타낸 것과 유사한 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

본 연구의 결과로부터, 돼지에서 수정란의 동결-용해 후 생존성의 향상을 위해서는 발육 단계가 높은 배반포기 단계에서의 동결이 요구되며 본 연

구에서 이용된 OPS 동결 방법이 폭넓게 활용될 것으로 사료되며, 향후 돼지 수정란의 동결에 의한 세포내의 미세소관과 cortical granule cell, 핵성숙 과정에 대한 미세구조 연구와 안정된 동결 방법과 동해 보호제에 관한 다양한 연구가 요구된다.

적 요

본 연구는 Open Pulled Straw(OPS)방법에 의해 동결-용해한 돼지 수정란의 체외 생존 능력을 검토하기 위하여 수행되었다. 미성숙 난자의 체외 성숙을 위하여, 돼지 난소는 도축장에서 회수하였으며, 난구세포로 쌓여있는 난자는 직경 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 함께 흡입에 의하여 회수하였다. 회수된 미성숙 난자의 체외 성숙을 위하여 5 mM hypotaurine, 0.57 mM cysteine, 10% 난포액, 10 IU/ml PMSG 및 10 IU/ml hCG가 함유된 NCSU-23 배양액 내에서 21~22 시간 배양 후, 호르몬 물질을 제거한 성숙 배양액 내에서 21~22 시간 동안 추가 배양하였다. 한편 체외 수정을 위하여 동결-용해한 정액은 5.56 mM glucose, 0.33 mM na-pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 4 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS 액을 가지고 1,500 rpm에서 10분간 2회 원심분리를 실시하여 세척하였다. 체외 수정을 위한 배양액은 pH 7.2 ~ 7.4에서 2 mM caffeine과 2 mg/ml BSA가 첨가된 mTBM 배양액을 이용하였다. 체외 수정시 정자의 최종 농도는 2.5×10^6 cells/ml로 조정하였다. 수정 8시간 후, 체외 발육을 위하여 5.0 mM hypotaurine, 4 mg/ml BSA 및 10 ng/ml EGF가 첨가된 NCSU-23액으로 옮겨 7일간 배양을 계속하였다. 그 후 배반포의 여러 단계에서 OPS 법에 의해 동결-보존하였다. 그 결과, 동결-용해 후 형태학적으로 정상적인 수정란의 비율은 초기 배반포(28.3%) 보다는 확장 배반포(38.9%)단계에서 동결했을 때 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 한편, 동결-용해 후 상해를 입은 수정란의 비율은 확장 배반포 보다는 초기 배반포 단계에서 동결된 수정란에서 유의적으로 높은 성적을 보였다($p < 0.05$). 또 다른 실험에서, 수정란의 동결-용해 후 형태학적으로 정상인 수정란을 48시간 추가 배양했을 때, Hatching

된 수정란의 비율은 초기 배반포, 배반포 및 확장 배반포 단계에서 동결-용해한 수정란에서 각각 6.7, 20.0 및 33.3%로 발육 단계가 높을수록 동결-용해 후의 생존율도 높게 나타났다. 본 연구의 결과로부터, 돼지에서 수정란의 동결-용해 후 생존성의 향상을 위해서는 발육 단계가 높은 배반포 단계에서의 동결이 요구되며 본 연구에서 이용된 OPS 동결 방법이 폭넓게 활용될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui C. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, 41:116-124.
- Dobrinsky JR. 2001. Cryopreservation of swine embryos: A Chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology*, 56:1333-1344.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.*, 62:564-570.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 98:179-185.
- Kaidi S, Donnay I, Lambert P, Dessy F and Massip A. 2000. Osmotic behavior of *in vitro* produce bovine blastocyst in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology*, 41:106-115.
- Kim MK, Lee SJ, Uhm EY, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1996. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *Korean J. Anim. Reprod.*, 20:119-126.
- Kim SW, Park CK, Cheong HT, Yang BK and Kim CI. 2001. Survival ability of porcine oocytes frozen-thawed by open pulled straw method. *Korean J. Emb. Trans.*, 16:117-126.
- Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol. Reprod. Dev.*,

- 58:342-347.
- Lewis IM, Lane MW and Vajta G. 1999. Pregnancy rate following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw(OPS) method. *Theriogenology*, 51: 168(Abstr.).
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocyst of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS and Lim JH. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum. Reprod.*, 14:2838-2843.
- Park JE and Ruffing H. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishnuma M and Kanagawa H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod. Fertil.*, 100:123129.
- Ushijima H, Yamakawa H and Nagashima H. 1996. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplet. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997a. Successful Vitrifications of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. *Cryo-Letter*, 18: 191-195.
- Vajta G, Greve T and Callesen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw(OPS) method. *Acta. Vet. Scand.*, 38:349-352.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997c. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-straw direct-dehydration. *J. Reprod. Fertil.*, 111:65-70.
- Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M, Greve T and Callesen H. 1998. Sterile application of the open pulled straw(OPS) vitrification method. *Cryo-Letter*, 19:389-392.
- Wang WH, Abeydeer LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocytes maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 111:101-108.
- Zhu SE, Kasa M, Otoge H, Sakurai T and Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocyst by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. Fertil.*, 98:139-145.
- 김미성, 김세웅, 정희태, 이상영, 양부근, 김정익, 박춘근. 2002. Vitrification법에 의한 돼지 난자의 동결-융해 후 생존능력에 있어서 동해 보호제와 Superoxide Dismutase의 영향. *한국수정란이식학회지*, 17:179-185.
- 김상근, 이명현, 남윤이. 1998. 돼지 수정란 및 미성숙 난자의 동결융해 후의 생존율에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 22:187-194.
- 김인덕, 안미현, 석호봉. 2004a. 미성숙 돼지 난자의 유리화 동결에 관한 연구: Open Pulled Straw (OPS), Electron Microscopic Grid(EMG) 및 Nylon Loop System(NLS)의 비교. *한국수정란이식학회지*, 19:27-34.
- 김인덕, 안미현, 허태영, 홍문표, 석호봉. 2004b. Open Pulled Straw(OPS) 방법에 의한 체외배양 동결수정란의 경산돈 이식 : 예비실험 결과. *한국수정란이식학회지*, 19:155-163.
- 안미현, 김인덕, 석호봉. 2004. 돼지 배아의 유리화 동결시 Cytochalasin B 의 농도와 처리 시간에 의한 효과. *한국수정란이식학회지*, 19:35-42.
- 이상영, 유재숙, 박영호, 이종술, 김형주. 2004. 돼지 수정란의 초급속 동결 보존. *한국축산기술협의회 학술발표 논문집*, 20:39-52.
- 이상영, 유재숙, 사수진, 박춘근. 2006. 배 발달단계와 Superoxide Dismutase가 Open Pulled Straw (OPS) 방법에 의해 동결-융해한 수정란의 생존성에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.*, 30:35-40.
- 이창희, 김창근, 박충생. 1997. 동결-융해된 돼지

난포란의 생존성에 대한 항해동제와 평형시간의 영향. 한국수정란이식학회지, 12:315-324.
정진관, 장원경, 유승환. 1990. 돼지 수정란의 동결에 관한 연구. 한국축산학회지, 32:445-449.
최인경, 석상현, 김광식, 송해범. 2006. 유리화 동

결액 노출이 돼지 미성숙 난포란의 성숙율, 수정율 및 배발달율에 미치는 영향. *Reprod. Dev. Biol.*, 28:173-179.

(접수일: 2006. 9. 14 / 채택일: 2006. 9. 23)